



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, C07K 13/00 C07H 21/00, C12Q 1/68 G01N 33/50, A61K 31/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/01555 (43) Date de publication internationale: 20 janvier 1994 (20.01.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00650 (22) Date de dépôt international: 29 juin 1993 (29.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/08081 1er juillet 1992 (01.07.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : AMLAIKY, Nour-dine [MA/FR]; 7, rue de Barr, F-67000 Strasbourg (FR). BOSCHERT, Ursula [DE/FR]; 6, cour du Moulin-Zorn, F-67000 Strasbourg (FR). HEN, René [FR/FR]; 3, rue Kageneck, F-67000 Strasbourg (FR). PLASSAT, Jean-Luc [FR/FR]; 62, rue de l'Hôpital, F-67100 Strasbourg (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>

(54) Title: POLYPEPTIDES HAVING SEROTONINERGIC ACTIVITY (5HT5A), NUCLEIC ACIDS CODING FOR THESE POLYPEPTIDES AND USES THEREOF

**(54) Titre: POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR SEROTONINERGIQUE (5HT5A), ACIDES NU-
CLEIQUES CODANT POUR CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS**

[illegible]

(57) Abstract

Novel polypeptides designated 5HT5a having serotonergic receptor activity, genetic material for their expression, any recombinant cell expressing said polypeptides, and uses thereof are disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides désignés 5HT5a ayant une activité de récepteur sérotoninergique, le matériel génétique permettant leur expression, toute cellule recombinante exprimant ces polypeptides, et leur utilisation.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brsil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DE RECEPTEUR
SEROTONINERGIQUE (5HT5A), ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR
CES POLYPEPTIDES ET UTILISATIONS.

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et le matériel
5 génétique permettant leur expression. Plus particulièrement, elle concerne de
nouveaux polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique.

La sérotonine est un neuromodulateur capable d'induire et de moduler une
grande variété de comportements tels que le sommeil, l'appétit, la locomotion,
l'activité sexuelle ou encore la contraction vasculaire. Il est admis que l'activité de la
10 sérotonine est médiée par son interaction avec des récepteurs, désignés récepteurs
sérotoninergiques ou récepteurs 5-HT (pour 5-hydroxytryptamine). Des études de
biologie moléculaire ainsi que des études pharmacologiques ont révélé qu'il existait
un grand nombre de sous-types de récepteurs 5-HT. Les récepteurs 5-HT qui ont été
décrits jusqu'à aujourd'hui appartiennent soit à la famille des récepteurs liés à des
15 canaux ioniques (récepteurs 5-HT₃), soit à la famille des récepteurs qui interagissent
avec des protéines G et qui possèdent sept domaines transmembranaires. Par ailleurs,
l'analyse des séquences d'acides aminés a montré que les récepteurs 5-HT
interagissant avec des protéines G peuvent être sous-divisés en deux groupes
distincts : Les récepteurs 5HT₁, comprenant les sous-types mammifères 5HT_{1A},
20 5HT_{1B} et 5HT_{1D} ainsi que trois récepteurs 5HT de drosophile; et les récepteurs
5HT₂ comprenant les sous-types 5HT₂ et 5HT_{1C}.

Ces récepteurs ne sont sans doute pas les seuls récepteurs 5HT existant, dans
la mesure où des études pharmacologiques ont révélé d'autres sous-types tels que les
récepteurs 5HT₄ ainsi que certains récepteurs apparentés au sous-type 5HT₁
25 (récepteurs "5HT₁ like"). De plus, des études supplémentaires de biologie
moléculaire ont également révélé des hétérogénéités au sein des sous-types
5HT_{1B}/1D.

La présente invention résulte de la mise en évidence de nouveaux
polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique. Bien qu'appartenant à
30 la famille des récepteurs qui interagissent avec des protéines G, ces nouveaux
polypeptides diffèrent des récepteurs sérotoninergiques déjà décrits (5HT₁, 5HT₂,
5HT₃ et 5HT₄) du point de vue structural comme du point de vue pharmacologique.
Plus particulièrement, l'invention résulte de l'isolement et de la caractérisation de ces

nouveaux polypeptides, désignés 5HT5a, ainsi que du matériel génétique permettant leur expression ou leur identification.

Un premier objet de l'invention réside donc dans des polypeptides comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 1 ou d'un dérivé de celle-ci.

5 Au sens de la présente invention, le terme dérivé désigne toute molécule obtenue par modification de nature génétique et/ou chimique de la séquence peptidique SEQ ID n° 1. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être générés dans des buts différents, tels
10 que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son(ses) ligand(s), celui d'améliorer ses niveaux de production, celui d'augmenter sa résistance à des protéases, celui d'augmenter et/ou de modifier son activité, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques. Parmi les dérivés résultant d'une addition, on peut citer par exemple les polypeptides chimères
15 comportant une partie hétérologue supplémentaire liée à une extrémité. Le terme dérivé comprend également les polypeptides homologues au polypeptide SEQ ID n° 1, issus d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes, et possédant une activité de même type. De tels polypeptides homologues peuvent être obtenus par des expériences d'hybridation comme décrit
20 dans les exemples. En particulier, l'invention concerne également les peptides de séquence SEQ ID n° 7 correspondant au récepteur humain.

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont des polypeptides possédant la capacité de lier la sérotonine. Encore plus préférentiellement, il s'agit de polypeptides ayant une activité de récepteur sérotoninergique. Toujours selon un
25 mode préféré, les polypeptides de l'invention sont susceptibles d'être reconnus par des anticorps reconnaissant la séquence peptidique SEQ ID n° 1 complète.

Un mode de réalisation particulier de l'invention est représenté par le polypeptide 5HT5a comprenant toute la séquence peptidique SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 7. Comme indiqué dans les exemples, ce polypeptide peut être exprimé dans
30 différents types cellulaires pour former un récepteur sérotoninergique fonctionnel.

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessous, par synthèse

chimique, sur la base de la séquence SEQ ID n° 1 en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, ou par une combinaison de ces techniques.

Dans ce qui suit, les polypeptides de l'invention tels que définis ci-dessus sont désignés par polypeptides 5HT5a.

5 La présente invention a également pour objet toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide 5HT5a. Plus préférentiellement, il s'agit d'une séquence choisie parmi :

(a) tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de son brin complémentaire,

10 (b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide tel que défini précédemment, et,

(c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.

15 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules
20 de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, notamment selon la méthode des phosphoramidites, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

25 Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être utilisées pour la production des polypeptides 5HT5a tels que définis précédemment. Dans ce cas, la partie codant pour ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, etc) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A
30 cet effet, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être

préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des polypeptides 5HT5a de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

Les séquences nucléotidiques de la présente invention sont également utilisables dans le domaine pharmaceutique, soit pour la réalisation de séquences antisens utilisables dans le cadre d'une thérapie génique, soit encore pour la réalisation de sondes permettant la détection, par des expériences d'hybridation, de l'expression de récepteurs sérotoninergiques dans des échantillons biologiques et la mise en évidence d'anomalies génétiques (polymorphisme, mutations) ou d'expressions aberrantes.

L'inhibition de l'expression de certains gènes par des oligonucléotides antisens s'est avérée être une stratégie prometteuse dans le contrôle de l'activité d'un gène. Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaire du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant sa traduction en protéine. L'invention a ainsi pour objet les oligonucléotides antisens capables d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides 5HT5a tels que définis précédemment. De tels oligonucléotides peuvent être constitués par tout ou partie des séquences nucléotidiques définies ci-avant. Il s'agit généralement de séquences ou de fragments de séquences complémentaires de séquences codant pour des peptides de l'invention. De tels oligonucléotides peuvent être obtenus à partir de la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 7, par fragmentation, etc, ou par synthèse chimique.

Comme indiqué ci-dessus, l'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant qui codent pour des polypeptides 5HT5a de

l'invention, ou avec les ARNm correspondant. De telles sondes peuvent être utilisées *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT5a, ou encore pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Compte tenu des activités multiples de la sérotonine, les sondes de l'invention peuvent ainsi permettre d'identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs 5HT5a. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT5a tels que définis précédemment, à partir d'autres sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines, ainsi qu'illustré dans les exemples. Les sondes de l'invention comportent généralement au moins 10 bases, et elles peuvent comporter jusqu'à l'intégralité de la séquence SEQ ID n° 1 ou SEQ ID n° 7 ou de leur brin complémentaire. Préférentiellement, ces sondes sont, préalablement à leur utilisation, marquées. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc). Les conditions d'hybridation dans lesquelles ces sondes peuvent être utilisées sont indiquées dans les techniques générales de clonage ci-après ainsi que dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées capables d'exprimer à leur surface un polypeptide 5HT5a tel que défini ci-avant. Ces cellules peuvent être obtenues par introduction d'une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus codant pour un polypeptide de l'invention, puis culture desdites cellules dans des conditions d'expression de ladite séquence.

Les cellules recombinées selon l'invention peuvent être aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes. Parmi les cellules eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, Cl27, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme cellules procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*. Les cellules ainsi obtenues peuvent être utilisées pour mesurer la capacité de différentes molécules à se comporter comme ligand ou comme modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention. Plus particulièrement, elles peuvent ainsi être utilisées dans un procédé de mise en évidence et d'isolement de

ligands ou de modulateur de l'activité des polypeptides de l'invention, et, plus préférentiellement, d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine.

Un autre objet de l'invention concerne donc un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des polypeptides 5HT5a de l'invention, selon lequel on
5 réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide de l'invention et ladite
10 molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de la sérotonine pour les polypeptides 5HT5a.

15 Un autre objet de l'invention concerne un procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des polypeptides 5HT5a de l'invention, selon lequel on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée telle que
20 décrite ci-dessus exprimant à sa surface un polypeptide de l'invention, en présence de 5HT, dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide de l'invention et le 5HT, et,
- on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du 5HT sur ledit polypeptide de l'invention.

25 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs peuvent en effet permettre de traiter certaines affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique liées aux récepteurs 5HT5a.

30 L'invention concerne également tout médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide 5HT5a de l'invention. Préférentiellement la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé décrit précédemment.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

5 SEQ ID n° 1 : Séquences nucléotidique et peptidique du récepteur 5HT5a. L'ADNc de 4 kb a été séquencé sur les 2 brins depuis le site EcoRI jusqu'à la position 1685. Les 2300 nucléotides restant n'ont pas été séquencés à l'exception de l'extrémité 3' contenant la queue polyA.

10 Figure 2 : Pourcentages d'homologie de séquence peptidique entre le récepteur 5HT5a SEQ ID n° 1 et d'autres récepteurs de la famille des récepteurs couplés à des protéines G. Les homologies ont été calculées sur les séquences conservées : le domaine transmembranaire et ses boucles de connexion.

15 Figure 3 : Courbe de saturation du [¹²⁵I]-LSD aux membranes des cellules Cos-7 exprimant le récepteur 5HT5a. Les membranes ont été incubées avec des concentrations de ligand allant de 50 pM à 1,25 nM, avec ou sans 10 µM de 5HT. La liaison spécifique est représentée. L'encart représente l'analyse en Scatchard des résultats.

Figure 4 : Mise en évidence de séquences homologues : (a) par Northern blot sur des ARNm polyA (5 µg) de différents tissus; (b) par PCR sur des ARN totaux (1 µg) de différents tissus.

20 Table 1 : Profil pharmacologique du récepteur 5HT5a. Les résultats correspondent à des expériences de compétition pour la liaison du [¹²⁵I]-LSD soit aux membranes des cellules Cos-7 exprimant le récepteur 5HT5a de manière transitoire, soit aux membranes des cellules NS4 exprimant le récepteur 5HT5a de manière stable. Les valeurs d'IC₅₀ (correspondant à la concentration en ligand nécessaire pour déplacer 50 % du [¹²⁵I]-LSD lié) ont été calculées expérimentalement et converties en K_i selon l'équation suivante : $K_i = IC_{50} / (1 + C/K_d)$ dans laquelle C est la concentration en [¹²⁵I]-LSD et K_d est la constante de dissociation du [¹²⁵I]-LSD (308 pM). Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre d'expériences indépendantes réalisées, chaque point étant réalisé en triple.

30 Techniques générales de clonage

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la

purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc, sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature

5 [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les enzymes de restriction ont été fournies par New England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham et sont utilisées

10 selon les recommandations des fournisseurs.

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

15 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes est effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un

20 traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de

25 PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354 ; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] est effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques est effectuée par la méthode

30 développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Pour les expériences d'hybridation, les conditions de stringence normales sont généralement les suivantes : hybridation : 3 x SCC en présence de 5 x Denhart's à 65°C ; lavage : 0,5 x SSC à 65°C.

1. Isolement du récepteur 5HT5a

Les comparaisons de séquences entre les différents récepteurs sérotoninergiques connus font apparaître une certaine conservation, particulièrement dans certaines régions transmembranaires potentielles telles que les domaines III t
5 IV. Dans le but de mettre en évidence et d'isoler un nouveau récepteur, trois oligonucléotides dégénérés correspondant à ces deux régions ont été préparés, puis utilisés dans une série de réactions de PCR sur une préparation d'ARN de cerveau de rat. La séquence des oligonucléotides dégénérés (i)-(iii) est donnée dans les séquences SEQ ID n° 2-4.

10 Les réactions de PCR ont été réalisées de la manière suivante : 5 µg d'ARN de cerveau de rat adulte ont été soumis à une réaction de transcription inverse en présence de 500 ng d'oligonucléotide (i) et de 200 unités de transcriptase inverse MMLV (BRL). La moitié du produit de cette réaction a ensuite été soumise à 30 cycles d'amplification en présence de 5 unités de polymérase Taq (Cetus) et de 1 µg
15 d'oligonucléotide (i) et d'oligonucléotide (ii). 1/20e du produit de cette réaction a ensuite été soumis à 30 cycles d'amplification supplémentaires en présence des oligonucléotides (i) et (iii). Les produits ainsi obtenus ont été digérés avec les enzymes BamHI et HindIII, insérés aux sites correspondant du plasmide Bluescript (Stratagène), et séquencés. L'un des fragments ainsi obtenus, présentant une certaine
20 homologie avec les récepteurs sérotoninergiques, a été marqué par "random priming" (Feinberg et Vogelstein, Analytical Biochemistry 132 (1984) 6) et utilisé comme sonde pour cribler une banque de cDNA de cerveau de rat construite dans le phage UniZap (Stratagène). Parmi les phages positifs obtenus, l'un d'entre-eux, dénommé λNS et porté par le plasmide pNS, contenait un insert de 4 kb. Ce phage a été isolé, et
25 son insert a ensuite été introduit dans le plasmide Bluescript. La séquence de ce fragment a été déterminée sur 1,6 kb environ sur les 2 brins en utilisant la technique des dideoxynucléotides au moyen d'oligonucléotides synthétiques.

La séquence ainsi obtenue est présentée sur la séquence SEQ ID n° 1. Elle montre que l'ADNc isolé porte une phase de lecture ouverte de 357 acides aminés.
30 Par ailleurs, l'analyse d'hydrophobicité montre que cette protéine porte sept domaines hydrophobes, une particularité rencontrée chez les membres de la famille des récepteurs couplés à des protéines G. L'extrémité N-terminale contient par ailleurs 2

sites de N-glycosylation, et le domaine cytoplasmique présumé contient les sites consensus de phosphorylation par les protéines kinases C et A.

2. Etude d'homologies de séquence

La séquence du récepteur 5HT5a isolé ci-dessus a été comparée avec les
5 séquences des récepteurs couplés à des protéines G suivants : 5HT1B, 5HT1D,
5HT1A, 5HT-dro2A, 5HT-dro1, $\alpha 2$, D2, $\beta 1$, D1, H2, 5HT1C et 5HT2. Ces
expériences ont révélé une certaine homologie dans le domaine transmembranaire
potentiel et dans certaines boucles, mais pas dans les régions terminales ni dans la
troisième boucle cytoplasmique. La figure 2 donne les % d'homologie au niveau des
10 régions conservées.

Comme il ressort de cette figure, l'homologie avec les récepteurs connus est
faible, le meilleur résultat étant obtenu avec le récepteur sérotoninergique de
drosophile HT-dro2A (37 % d'homologie).

3. Expression du récepteur 5HT5a dans les cellules Cos-7 et caractérisation 15 pharmacologique

Le fragment d'ADNc isolé dans l'exemple 1 a été inséré dans un vecteur
d'expression eucaryote, qui a été utilisé pour transfecter des cellules Cos-7. Les
membranes des cellules transfectées obtenues ont ensuite été préparées et testées pour
leur capacité à lier certains ligands sérotoninergiques marqués.

20 L'ADNc de 4 kb codant pour le récepteur 5HT5a a été isolé à partir du
plasmide pNS sous forme d'un fragment EcoRI-XhoI, puis inséré aux sites
correspondants du vecteur p513. Le vecteur p513 dérive du vecteur pSG5 [Green et
al., Nucl. Acids Res. 16 (1988) 369] par addition d'un multisite de clonage. Le
vecteur recombinant ainsi obtenu désigné p513NS a ensuite été utilisé (20 μ g par
25 plaque de 10 cm) pour transfecter les cellules Cos-7 en présence de phosphate de
calcium.

48 heures après la transfection, les cellules recombinantes sont récoltées et
les membranes sont préparées selon la technique décrite par Amlaiky et Caron
[J. Biol. Chem. 260 (1985) 1983]. Des expériences de liaison à saturation et de
30 compétition ont ensuite été réalisées sur ces membranes en présence des ligands
radiomarqués suivants : [125 I]-LSD ; [125 I]-cyanopindolol ; [3 H]-8-OH-DPAT et
[3 H]-spiperone. Pour cela, les échantillons de membrane (10-20 μ g de protéines) ont

été incubés 10 minutes à 37°C en présence du ligand dans un volume final de 250 µl de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). La réaction est ensuite stoppée par filtration sous vide sur filtres en fibre de verre Whatman GF/C, et rinçage 4 fois avec 4 ml de tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). La liaison non-spécifique a été déterminée en présence de 10 µM de 5HT. La radioactivité a été mesurée avec un compteur γ.

Les résultats obtenus montrent que, bien que le [¹²⁵I]-cyanopindolol ; le [³H]-8-OH-DPAT et le [³H]-spiperone ne lient pas les membranes préparées, le [¹²⁵I]-LSD présente un site de liaison saturable avec un K_d = 340 pM et un B_{max} = 1,6 pmol/mg de protéines membranaires (figure 3). Dans une expérience contrôle, il a par ailleurs été montré que le [¹²⁵I]-LSD ne liait pas les cellules Cos-7 transfectées par le plasmide p513.

Pour déterminer le profil pharmacologique de ce récepteur, le [¹²⁵I]-LSD lié aux membranes a été déplacé en présence de différentes drogues sérotoninergiques (table 1). Ces différentes drogues montrent l'ordre d'efficacité de déplacement suivant : 2-bromo-LSD > ergotamine > 5-CT > methysergide > 5HT = RU24969 > bufotenine > yohimbine = 8-OH-DPAT (table 1). La kétansérine, le (+) pindolol, le sumatriptan, la dopamine et la norépinéphrine sont inactifs.

4. Expression du récepteur 5HT5a dans les cellules NIH-3T3 et étude pharmacologique

L'ADNc cloné dans l'exemple 1 a également été exprimé dans les cellules NIH-3T3, qui n'expriment aucun récepteur sérotoninergique de manière endogène. Pour cela, le vecteur d'expression recombinant décrit en 3. ci-dessus a été utilisé. Il a été introduit (20 µg par plaque de 10 cm) dans les cellules NIH-3T3 par transfection en présence de phosphate de calcium, en même temps que le vecteur pRSVnéo [Gorman et al., Science 221 (1983) 551], portant le gène de résistance au G418 (1 µg par plaque de 10 cm). Les clones transformants ont été sélectionnés en présence de 0,5 mg de G418. Les clones isolés ont ensuite été amplifiés et les RNA totaux de ces clones ont été préparés et analysés en Northern Blot pour l'expression d'ARNm du 5HT5a. 2 clones ont ainsi été sélectionnés, NS1 et NS4, exprimant respectivement des niveaux élevés et faibles d'ARNm du 5HT5a.

Les membranes des cellules de ces clones ont ensuite été préparées et testées dans les conditions décrites ci-dessus pour leur capacité à lier certains ligands

sérotoninergiques marqués, et pour déterminer l'affinité des récepteurs pour lesdits ligands.

Les résultats obtenus montrent que les membranes de ces 2 clones possèdent des sites de liaison de haute affinité pour le [¹²⁵I]-LSD, indiquant que ces 2 clones expriment des récepteurs 5HT5a. Une expérience contrôle a en effet montré que les cellules NIH-3T3 non transfectées étaient incapables de lier le [¹²⁵I]-LSD. Différentes expériences de déplacement ont ensuite été réalisées (table 1). Dans le cas du 5HT, du 5CT, du sumatriptan et du 8-OH-DPAT, les courbes de compétition obtenues étaient biphasiques, et une analyse des résultats a révélé 2 composants de liaison, l'un avec une affinité élevée et l'autre avec une affinité plus faible.

5. Recherche de séquences homologues dans d'autres tissus

La séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 a ensuite été utilisée pour la mise en évidence de séquences homologues à partir d'autres tissus. Pour cela, trois techniques ont été utilisées :

- l'hybridation en Northern blot,
- la PCR
- l'hybridation *in situ*.

Les tissus utilisés pour la recherche de séquences homologues sont les suivants d'origine murine : cerveau, cervelet, rein, foie, moelle épinière, rate, poumon et coeur.

5.1. Recherche par hybridation en Northern blot.

Les ARNm-polyA ont été préparés à partir des tissus indiqués ci-dessus selon la technique décrite par Cathala et al. (DNA 2(4) (1983)), suivie d'un passage sur colonne d'oligodT-cellulose. Ces ARNm ont ensuite été fractionnés sur gel
5 d'agarose-formaldéhyde à 1%, puis transférés sur filtre de nitro-cellulose. La sonde utilisée pour l'hybridation correspond au fragment EcoRI-XhoI de 4 kb entier décrit dans l'exemple 1 (SEQ ID n° 1), préalablement marqué au ³²P par "random priming". L'hybridation a été réalisée dans des conditions de stringence élevées : 42°C, dans un tampon phosphate de sodium 20 mM (pH 6,5) contenant 50% de formamide, 5 x
10 SSC, 1 x Denhardt's, 0,1 % de SDS et 100 µg/ml d'ARNt. Les lavages ont été effectués à 60°C dans un tampon 0,1 x SSC, 0,1 % SDS.

Cette étude a permis de mettre en évidence trois transcrits homologues dans le cerveau et le cervelet, de 5,8 kb, 5 kb et 4,5 kb (figure 4a).

5.2. Recherche par PCR

15 Pour la recherche par PCR, les sondes (iv) SEQ ID n° 5 et (v) SEQ ID n° 6 ont été utilisées.

La sonde (iv) correspond à la position 1351 sur la séquence SEQ ID n° 1 et la sonde (v) à la position 947.

Les ARN totaux ont été préparés à partir des différents tissus étudiés, en
20 utilisant la technique décrite par Cathala et al. précitée. 1 µg de ces ARN a été soumis à une transcription inverse en présence de 200 unités de transcriptase inverse MMLV et de 300 ng de la sonde (iv), pendant 1 heure à 37°C. La moitié du produit de cette réaction a ensuite été amplifiée (30 cycles) en présence de 5 unités de la polymérase Taq (Cetus) et de 500 ng des sondes (iv) et (v). Un aliquot de cette réaction a
25 également été prélevé après 20 cycles d'amplification. Les produits ainsi obtenus ont ensuite été transférés sur filtres de nitro-cellulose et hybridés dans les conditions décrites en 5.1. ci-dessus.

Cette étude a permis de mettre en évidence des fragments d'ADN spécifiques homologues dans la moelle épinière et le cerveau (figure 4b).

30 5.3. Recherche par hybridation *in situ*

Les expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur des sections cryostatées de cerveau de rat adulte (8 semaines environ) selon la technique décrite par Hafen et al. [EMBO J. 2 (1983) 617]. La sonde utilisée pour ces expériences est un ARN simple brin obtenu par transcription en présence de polymérase T7, de
5 [35S]-CTP en utilisant le plasmide pNS comme matrice.

Cette étude a permis de mettre en évidence des séquences homologues selon l'invention dans le cortex cérébral, l'hippocampe et la couche granulaire du cervelet et dans le bulbe olfactif.

6. Isolement du récepteur humain

10 Selon la méthodologie décrite en 5. ci-dessus, le récepteur 5HT5a humain a été cloné.

Pour cela, une banque d'ADN génomique humain a été préparée à partir de placenta, par digestion partielle par l'enzyme MboI, séparation sur gradients de sels, et sous clonage dans le vecteur Lamda GEM 12 linéarisé par BamHI (bactérie hôte: TAP
15 90).

La banque ainsi obtenue a ensuite été criblée au moyen de la sonde décrite dans l'exemple 5.1. Les fragments de DNA qui hybrident avec cette sonde ont été isolés, sous clonés dans un plasmide Bluescript, amplifiés, puis séquencés dans les deux sens selon la technique dideoxynucleotide. L'amplification a été réalisée par la
20 technique PCR : 20 cycles en présence de *Thermus aquaticus* polymerase (2,5 unités; Cetus) et d'oligonucléotides 1 (SEQ ID n° 8), 2 (SEQ ID n° 9) pour la partie A du récepteur en amont de l'intron, d'oligonucléotides 3 (SEQ ID n° 10), 4 (SEQ ID n° 11) pour la partie B du récepteur en aval de l'intron. Le fragment A a été digéré par les enzymes NotI et XhoI et le fragment B par les enzymes EcoRI et XhoI. Ces fragments
25 ont été sous clonés dans un vecteur d'expression P514.

La séquence obtenue est présentée sur la séquence SEQ ID n° 7.

Il est entendu que les mêmes expériences peuvent être répétées en utilisant d'autres tissus et notamment des tissus d'origine humaine, et d'autres sondes. Par ailleurs, les séquences homologues mises en évidence lors de ces expériences peuvent
30 évidemment être ensuite isolées et/ou amplifiées par les techniques classiques de biologie moléculaire.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165

10

(ii) TITRE DE L' INVENTION: NOUVEaux polypeptides ayant une activit
de recepteur serotoninergique, acides nucleiques codant pour ces
polypeptides et utilisation.

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

20

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

30

(A) LONGUEUR: 1686 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

40

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Souris

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

45

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 509..1582
(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "Gene recepteur 5HT5A
souris"

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGCAGGAGGC CGTCTCCAGA AAGCAGGTAT CTACGTGGCT TCCAGTCCCC AACCCCCACC	60
CCTCGGAGCC ACTGCCGGGA GAGGGGGGAG GTGGGCAAGG AGCAACCCTG GACCAGCGAC	120
TGTTCTGACG CACTAGCTGA GTTCTGGGCA TCCACCCTGC ACTGGGCGGG GGCGACCCAA	180
GGATGCTCTG CTGCAGGCGA CCAGACAACA GTCTCCGCCT AGGTGAGGAA CAGCAAGGCA	240
TGTGATAGCA AAAGGCGGGC CCTGGCTTCT AGATTCAGCC CCTTGAGTCC GCTTTCCATA	300
TCTCTAAGGA TACCTGGGCT GTGCTGCTTG TAGCCCAGCA CCCTCCTCTC TGCTACAATT	360

55

60

	TCCTCCGGAC	TCTGACTGGG	TGGAGACTGA	GGCCAGGTC	TTGGCTCTTA	GCAAATCCT	420
	CTCCATTGGC	CATCGGTCGC	AAACATCTAG	ATTGACTTCA	GTGGGCTCGG	TGGCAACACA	480
5	GTCTAAACAC	AGGTGTCCTG	GGACAGCA	ATG GAT CTG CCT GTA AAC TTG ACC			532
				Met Asp Leu Pro Val Asn Leu Thr			
				1	5		
10	TCC TTT TCT CTC TCT ACT CCC TCC TCT TTG GAA CCT AAC CGC AGC TTG						580
	Ser Phe Ser Leu Ser Thr Pro Ser Ser Leu Glu Pro Asn Arg Ser Leu						
	10			15	20		
15	GAC ACG GAA GTC CTG CGC CCT AGT CGG CCT TTT CTC TCA GCT TTC CGA						628
	Asp Thr Glu Val Leu Arg Pro Ser Arg Pro Phe Leu Ser Ala Phe Arg						
	25		30	35	40		
20	GTG CTA GTC CTG ACT TTG TTG GGC TTT CTA GCT GCG GCC ACA TTC ACT						676
	Val Leu Val Leu Thr Leu Leu Gly Phe Leu Ala Ala Ala Thr Phe Thr						
	45	50	55				
25	TGG AAC CTG CTG GTG CTG GCT ACC ATC CTC AAG GTA CGC ACC TTC CAC						724
	Trp Asn Leu Val Leu Ala Thr Ile Leu Lys Val Arg Thr Phe His						
	60	65	70				
30	CGA GTA CCA CAC AAC CTG GTA GCT TCC ATG GCC ATC TCG GAT GTG CTA						772
	Arg Val Pro His Asn Leu Val Ala Ser Met Ala Ile Ser Asp Val Leu						
	75	80	85				
35	GTG GCT GTG CTG GTT ATG CCA CTG AGC CTG GTA CAT GAG CTG TCT GGG						820
	Val Ala Val Leu Val Met Pro Leu Ser Leu Val His Glu Leu Ser Gly						
	90	95	100				
40	CGC CGC TGG CAG CTG GGC CGG CGT CTA TGC CAG CTG TGG ATC GCA TGT						868
	Arg Arg Trp Gln Leu Gly Arg Arg Leu Cys Gln Leu Trp Ile Ala Cys						
	105	110	115				120
45	GAC GTG CTC TGC TGT ACT GCC AGC ATC TGG AAT GTG ACA GCA ATA GCA						916
	Asp Val Leu Cys Cys Thr Ala Ser Ile Trp Asn Val Thr Ala Ile Ala						
	125	130	135				
50	CTG GAC CGC TAC TGG TCA ATC ACG CGC CAC CTG GAG TAC ACA CTC CGT						964
	Leu Asp Arg Tyr Trp Ser Ile Thr Arg His Leu Glu Tyr Thr Leu Arg						
	140	145	150				
55	ACC CGC AAG CGT GTC TCC AAT GTG ATG ATC CTG CTC ACC TGG GCA CTC						1012
	Thr Arg Lys Arg Val Ser Asn Val Met Ile Leu Leu Thr Trp Ala Leu						
	155	160	165				
60	TCC ACT GTC ATC TCT CTG GCT CCA CTG CTA TTT GGC TGG GGA GAG ACT						1060
	Ser Thr Val Ile Ser Leu Ala Pro Leu Leu Phe Gly Trp Gly Glu Thr						
	170	175	180				
65	TAT TCT GAG CCC AGT GAG GAA TGC CAA GTC AGT CGC GAG CCT TCC TAC						1108
	Tyr Ser Glu Pro Ser Glu Glu Cys Gln Val Ser Arg Glu Pro Ser Tyr						
	185	190	195				200
70	ACC GTG TTC TCC ACC GTG GGT GCC TTC TAC CTG CCG CTG TGG CTG GTG						1156
	Thr Val Phe Ser Thr Val Gly Ala Phe Tyr Leu Pro Leu Trp Leu Val						
	205	210	215				
75	CTC TTT GTG TAC TGG AAA ATT TAC AGG GCG GCG AAA TTC CGC ATG GGC						1204
	Leu Phe Val Tyr Trp Lys Ile Tyr Arg Ala Ala Lys Phe Arg Met Gly						
	220	225	230				

17

5	TCC AGG AAG ACT AAC AGC GTC TCC CCC GTA CCC GAA GCT GTG GAG GTG Ser Arg Lys Thr Asn Ser Val Ser Pro Val Pro Glu Ala Val Glu Val	1252
	235 240 245	
10	AAG AAT GCT ACA CAA CAT CCC CAG ATG GTG TTC ACG GCC CGC CAT GCC Lys Asn Ala Thr Gln His Pro Gln Met Val Phe Thr Ala Arg His Ala	1300
	250 255 260	
15	ACC GTC ACC TTC CAG ACA GAA GGG GAT ACG TGG AGG GAG CAG AAG GAG Thr Val Thr Phe Gln Thr Glu Gly Asp Thr Trp Arg Glu Gln Lys Glu	1348
	265 270 275 280	
20	CAA AGG GCA GCC CTC ATG GTG GGC ATC CTC ATC GGA GTG TTT GTG CTC Gln Arg Ala Ala Leu Met Val Gly Ile Leu Ile Gly Val Phe Val Leu	1396
	285 290 295	
25	TGC TGG TTC CCT TTC TTC GTC ACA GAG CTC ATC AGT CCC CTG TGT TCC Cys Trp Phe Pro Phe Phe Val Thr Glu Leu Ile Ser Pro Leu Cys Ser	1444
	300 305 310	
30	TGG GAC GTC CCT GCC ATC TGG AAG AGC ATC TTC CTG TGG TTG GGC TAT Trp Asp Val Pro Ala Ile Trp Lys Ser Ile Phe Leu Trp Leu Gly Tyr	1492
	315 320 325	
35	TCT AAT TCC TTC TTC AAC CCA CTC ATC TAC ACA GCA TTC AAC AGG AGC Ser Asn Ser Phe Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Thr Ala Phe Asn Arg Ser	1540
	330 335 340	
40	TAC AGC AGT GCT TTC AAG GTC TTC TTC TCC AAG CAA CAA TGAGAGACCA Tyr Ser Ser Ala Phe Lys Val Phe Phe Ser Lys Gln Gln	1589
	345 350 355	
45	CATGGGAGTG CCTTCTTCCC ATAGCTTGTA GCTCAGTGGG TTATATTGTC CCATGAACCT	1649
	TTGCAGGCTG CCCAGCTGTC TTTGAGGACA AGATCCA	1686

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

45 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: oligonucleotide (i)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AGAACTAGTG GATCCAARAA NGGNARCCAR CA

32

50 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide (ii)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CTTGATATCG AATTCGAYRT NCTNTGYTGY AC

32

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

15

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide (iii)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

20 GGTATCGATA AGCTTATHGC YCTNGAYMGN TA

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide (iv)

30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CTTCTGCTCC CTCCACGTAT C

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique

35

(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

5 (A) ORGANISME: oligonucleotide (v)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CGCCACCTGG AGTACACACT C

21

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1074 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
15 (C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

25 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 1..1074

(D) AUTRES RENSEIGNEMENTS: /product= "GENE DU RECEPTEUR 5HT5A HUMAIN"

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

35	ATG GAT TTA CCT GTG AAC CTA ACC TCC TTT TCC CTC TCC ACC CCC TCC	48
	Met Asp Leu Pro Val Asn Leu Thr Ser Phe Ser Leu Ser Thr Pro Ser	
	1 5 10 15	
40	CCT TTG GAG ACC AAC CAC AGC CTC GGC AAA GAC GAC CTG CGC CCC AGC	96
	Pro Leu Glu Thr Asn His Ser Leu Gly Lys Asp Asp Leu Arg Pro Ser	
	20 25 30	
45	TCG CCC CTG CTC TNG GTC NTC GGA GTG CTT ATT CTC ACC TTG CTG GGC	144
	Ser Pro Leu Leu .X Val X Gly Val Leu Ile Leu Thr Leu Leu Gly	
	35 40 45	
50	TTT CTG GTG GCG GCG ACG TTC GCC TGG AAC CTG CTG GTG CTG GCG ACC	192
	Phe Leu Val Ala Ala Thr Phe Ala Trp Asn Leu Leu Val Leu Ala Thr	
	50 55 60	
55	ATC CTC CGT GTA CGC ACC TTC CAC CGC GTG CCC CAC AAC CTG GTG GCA	240
	Ile Leu Arg Val Arg Thr Phe His Arg Val Pro His Asn Leu Val Ala	
	65 70 75 80	
55	TCC ATG GCC GTC TCG GAT GTC CTG GTG GCC GCG CTG GTC ATG CCG CTG	288
	Ser Met Ala Val Ser Asp Val Leu Val Ala Ala Leu Val M t Pro Leu	
	85 90 95	

	AGC	CTG	GTG	CAC	GAG	CTG	TCC	GGG	CGC	CGC	TGG	CAG	CTA	GGT	CGG	AGG	336
	Ser	Leu	Val	His	Glu	Leu	Ser	Gly	Arg	Arg	Trp	Gln	Leu	Gly	Arg	Arg	
				100					105					110			
5	CTG	TGC	CAG	CTT	TGG	ATC	GCG	TGC	GAC	GTG	CTT	TGC	TGC	ACG	GCC	AGC	384
	Leu	Cys	Gln	Leu	Trp	Ile	Ala	Cys	Asp	Val	Leu	Cys	Cys	Thr	Ala	Ser	
			115					120					125				
10	ATC	TGG	AAC	GTG	ACG	GCC	ATA	GCA	CTG	GAC	CGC	TAC	TGG	TCC	ATC	ACG	432
	Ile	Trp	Asn	Val	Thr	Ala	Ile	Ala	Leu	Asp	Arg	Tyr	Trp	Ser	Ile	Thr	
		130					135					140					
15	CGC	CAC	ATG	GAA	TAC	ACG	CTC	CGC	ACC	CGC	AAG	TGC	GTC	TCC	AAC	GTC	480
	Arg	His	Met	Glu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Thr	Arg	Lys	Cys	Val	Ser	Asn	Val	
	145				150						155					160	
20	ATG	ATC	GCG	CTC	ACC	TGG	GCA	CTC	NCC	ACT	GTC	ATC	TCT	CTG	GCC	CCG	528
	Met	Ile	Ala	Leu	Thr	Trp	Ala	Leu	X	Thr	Val	Ile	Ser	Leu	Ala	Pro	
				165						170					175		
25	CTG	CTT	TTT	GGC	TGG	GGA	GAG	ACG	TAC	TCT	GAG	GGC	AGC	GAG	GAG	TGC	576
	Leu	Leu	Phe	Gly	Trp	Gly	Glu	Thr	Tyr	Ser	Glu	Gly	Ser	Glu	Glu	Cys	
				180					185					190			
30	CAG	GTA	AGC	CGC	GAG	CCT	TCC	TAC	GCC	GTG	TTC	TCC	ACC	GTA	GGC	GCC	624
	Gln	Val	Ser	Arg	Glu	Pro	Ser	Tyr	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	
			195					200					205				
35	TTC	TAC	CTG	CCG	CTC	TGT	GTG	GTG	CTC	TTC	GTG	TAC	TGG	AAG	ATC	TAC	672
	Phe	Tyr	Leu	Pro	Leu	Cys	Val	Val	Leu	Phe	Val	Tyr	Trp	Lys	Ile	Tyr	
		210					215					220					
40	AAG	GCT	ACC	AAG	TTC	CGC	GTG	GGC	TCC	AGG	AAG	ACC	AAT	AGC	GTC	TCA	720
	Lys	Ala	Thr	Lys	Phe	Arg	Val	Gly	Ser	Arg	Lys	Thr	Asn	Ser	Val	Ser	
	225					230					235					240	
45	CCC	ATA	TCC	GAA	GCT	GTG	GAG	GTG	AAG	GAC	TCT	GCC	CAA	CAG	CCC	CAG	768
	Pro	Ile	Ser	Glu	Ala	Val	Glu	Val	Lys	Asp	Ser	Ala	Gln	Gln	Pro	Gln	
				245						250					255		
50	ATG	GTG	TTC	ACG	GTC	CGC	CAC	GCC	ACC	GTC	ACC	TTC	CAG	CCA	GAA	GGG	816
	Met	Val	Phe	Thr	Val	Arg	His	Ala	Thr	Val	Thr	Phe	Gln	Pro	Glu	Gly	
				260					265					270			
55	GAC	ACG	TGT	CGG	GAG	CAG	AAG	GAG	CAG	CGG	CCC	GCC	CTC	ATG	GTG	GGC	864
	Asp	Thr	Cys	Arg	Glu	Gln	Lys	Glu	Gln	Arg	Pro	Ala	Leu	Met	Val	Gly	
			275					280					285				
60	ATC	CTC	ATT	GGC	GTG	TTC	GTG	CTC	TGC	TGG	ATC	CCC	TTC	TTT	CTC	ACC	912
	Ile	Leu	Ile	Gly	Val	Phe	Val	Leu	Cys	Trp	Ile	Pro	Phe	Phe	Leu	Thr	
		290					295					300					
65	GAG	CTC	ATC	AGT	CCC	CTC	TGC	TCC	TGT	GAC	ATC	CCC	GCC	ATC	TGG	AAA	960
	Glu	Leu	Ile	Ser	Pro	Leu	Cys	Ser	Cys	Asp	Ile	Pro	Ala	Ile	Trp	Lys	
	305					310					315					320	
70	AGC	ATC	TTC	CTG	TGG	CTT	GGC	TAC	TCC	AAC	TCC	TTC	TTT	AAC	CCC	CTG	1008
	Ser	Ile	Phe	Leu	Trp	Leu	Gly	Tyr	Ser	Asn	Ser	Phe	Phe	Asn	Pro	Leu	
				325						330					335		
75	ATC	TAT	ACG	GCT	TTC	AAC	AAG	AAC	TAC	AAC	AGC	GCC	TTC	AAG	AAC	TTC	1056
	Ile	Tyr	Thr	Ala	Phe	Asn	Lys	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Phe	Lys	Asn	Phe	
				340					345					350			

21

TTT TCT AGG CAA CAC TG
Phe Ser Arg Gln His
355

1074

5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

10

- (A) LONGUEUR: 43 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc**(vi) ORIGINE:**

15

- (A) ORGANISME: oligonucleotide 1

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GCATGCGCGC GGCCGCGGCA CCATGGATTT ACCTGTGAAC CTA

43

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

25

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc**(vi) ORIGINE:**

- (A) ORGANISME: oligonucleotide 2

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TTCGGATATC GGTGAGACGC

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:**(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:**

35

- (A) LONGUEUR: 41 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

40

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide 3

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

5 CCGATATCCG AAGCTGTGGA GGTGAAGGAC TCTGCCCAAC A 41

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 37 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

10 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: oligonucleotide 4

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

AACCCGGGCT TAAGTCAGTG TTGCCTAGAA AAGAAGT 37

TABLE 1

	pKi			
	5HT5 (Cos-7)	5HT5 (NIH-3T3) low high	5HT1D (rat cortex)	5HT1D (Calf caudate)
5-HT	6.6 (7)	6.2 (2) 8.0 (2)	8.7	8.4
5-CT	7.8 (3)	7.9 (2) 9.5 (2)	8.6	8.6
RU24969	6.5 (2)			7.3
TFMPP	5.6 (2)		6.6	6.2
8-OH-DPAT	5.9 (2)	5.7 (2) 7.0 (2)	6.6	5.9
Sumatriptan	4.8 (2)	5.2 (2) 7.8 (2)		7.5
Bufotenine	6.0 (2)			8.1
Methysergide	7.2 (5)	7.1 (2)	7.3	8.4
Ergotamine	8.4 (2)			7.8
2-Bromo LSD	8.7 (2)			
Yohimbine	6.0 (2)			7.1
(±)Pindolol	4.7 (2)		<5	5.2
(-)Propanolol	4.9 (2)			5.5
Ketanserin	4.8 (2)		<5	5.7
Spiperone	5.6 (2)			5.3
Dopamine	4.1 (2)			
(-)Norepinephrine	2.8 (2)			

REVENDICATIONS

1. Polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID n° 1 ou d'un dérivé de celle-ci.
2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il possède la
5 capacité de lier la sérotonine.
3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il possède une activité de récepteur sérotoninergique.
4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il
10 peut être reconnu par des anticorps reconnaissant la séquence peptidique complète SEQ ID n° 1.
5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend toute la séquence peptidique SEQ ID n° 1.
6. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence peptidique SEQ ID n° 7.
7. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des
15 revendications 1 à 6.
8. Séquence selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
 - (a) tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de son brin
20 complémentaire,
 - (b) toute séquence hybridant avec une séquence (a) et codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, et,
 - (c) les séquences dérivées des séquences (a) et (b) en raison de la dégénérescence du code génétique.
9. Séquence selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'elle comprend tout
25 ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 7.
10. Séquence selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, les séquences hybrides ou les séquences synthétiques ou semi-synthétiques.

11. Séquence selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée en ce que la partie codant pour ledit polypeptide est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.
12. Oligonucléotide antisens capable d'inhiber au moins partiellement la
5 production de polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6.
13. Oligonucléotide selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est constitué par tout ou partie d'une séquence nucléotidique selon la revendication 8.
14. Sonde nucléotidique capable de s'hybrider avec une séquence selon la revendication 8 ou avec l'ARNm correspondant.
- 10 15 Sonde selon la revendication 14 caractérisée en ce qu'elle comporte au moins 10 bases.
16. Sonde selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'elle comporte l'intégralité de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 7 ou de leur brin complémentaire.
- 15 17. Sonde selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences SEQ ID n° 5, 6, 8-11.
18. Utilisation d'une sonde selon l'une des revendications 14 à 17 pour la détection de l'expression d'un récepteur sérotoninergique 5HT5a; ou pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations
20 ponctuelles, etc); ou pour identifier des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique comme étant liées aux récepteurs 5HT5a; ou encore pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour des polypeptides 5HT5a.
19. Cellule recombinée capable d'exprimer à sa surface un polypeptide selon
25 l'une des revendications 1 à 6.
20. Cellule selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules eucaryotes ou procaryotes.

21. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de ligands des polypeptides tels que définis dans les revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

- 5 - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 19 exprimant à sa surface un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 6 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,
- 10 - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.

22. Procédé selon la revendication 21 pour la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes ou d'antagonistes de la sérotonine.

23. Procédé de mise en évidence et/ou d'isolement de modulateurs des polypeptides tels que définis dans les revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

- 15 - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec une cellule recombinée selon la revendication 19 exprimant à sa surface un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 6, en présence de 5HT, dans des conditions permettant l'interaction
- 20 entre ledit polypeptide et le 5HT, et,
- on détecte et/ou isole les molécules capables de moduler l'activité du 5HT sur ledit polypeptide.

24 Ligand ou modulateur d'un polypeptide tel que défini dans les revendications 1 à 6, susceptible d'être obtenu selon les procédés des revendications 21 à 23.

25 25. Utilisation d'un ligand ou modulateur identifié et/ou obtenu selon les procédés des revendications 21 à 23 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des affections neurologique, cardiovasculaire ou psychiatrique liées aux récepteurs 5HT5a.

30 26. Médicament comprenant comme principe actif au moins une molécule agissant sur un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6.

27. Médicament selon la revendication 26 caractérisé en ce que la molécule est un ligand ou un modulateur identifié et/ou isolé selon le procédé des revendications 21 à 23.

2/3

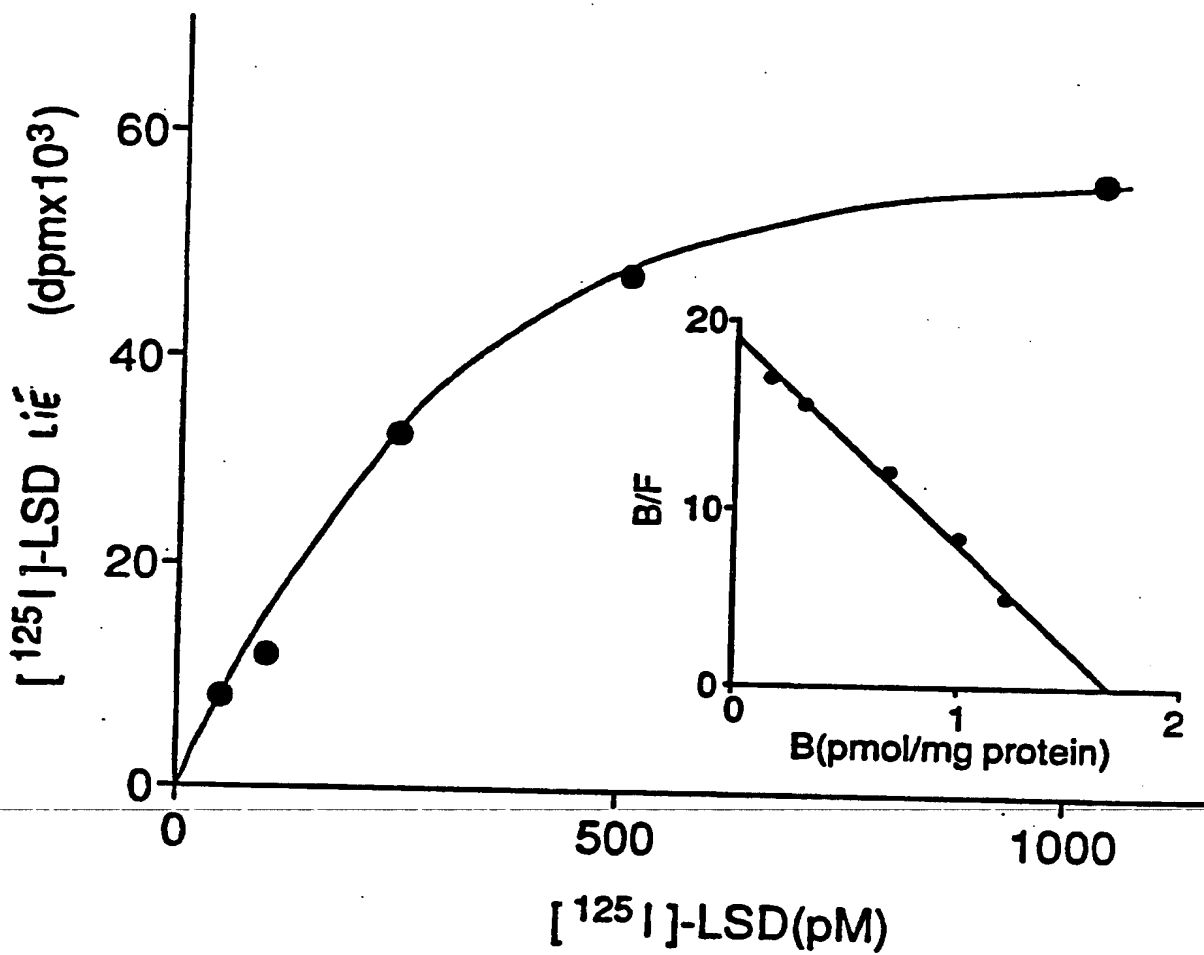


FIGURE 3

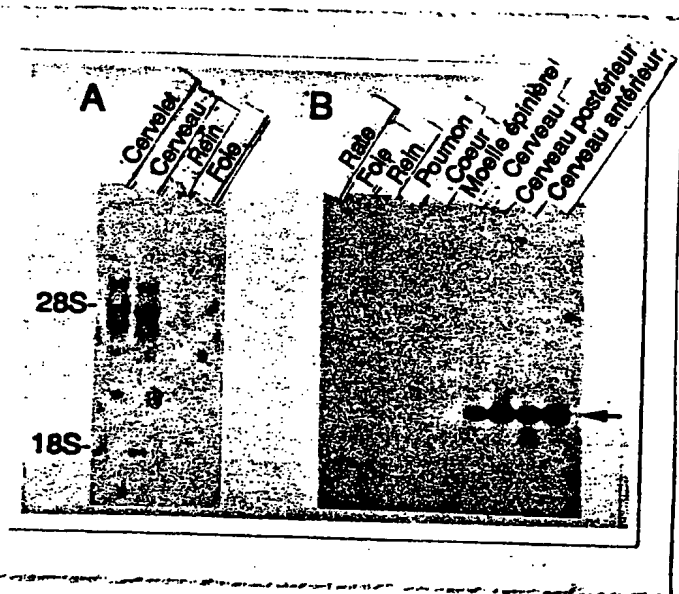


FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/FR 93/00650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C12N15/12; C07K13/00; C07H21/00; C12Q1/68; G01N33/50; A61K31/00

According to International Patent Classification (IPC) r to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12N; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,9117174 (NEUROGENETIC CORP) 14 November 1991 claims, figure 3	1-3,6-8, 10-15, 19-27
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Vol 89, No. 12, 15 June 1992, WASHINGTON US pages 5517 - 5521 McAllister G; Charlesworth A; Snodin C; Beer MS; Noble AJ; Middlemiss DN; Iversen LL;Whiting P; "Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): a fifth 5HT1-like subtype." see the whole document	1-3,6-8,10-15 19-27 ./...

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 September 1993 (20.09.93)

Date of mailing of the international search report

29 September 1993 (29.09.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile N .

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N° .

PCT/FR 93/00650

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,4041464 (BASF AG) 25 June 1992 see the whole document	1-3,6-8, 10-15, 19-27
P,X	EMBO JOURNAL. Vol.11, No. 13, December 1992, EYNHAM, OXFORD GB pages 4779-4786 PLASSAT, J.L. ET AL.; "The mouse 5HT5 receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT1D receptor family" see the whole document	1-27
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. Vol.90, april 1993, WASHINGTON US pages 3452 - 3456 ERLANDER M.G. ET AL: "Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain" see the whole document	1-27

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300650
SA 75633

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

20/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9117174	14-11-91	US-A- 5155218	13-10-92
		AU-A- 7879891	27-11-91
		EP-A- 0530265	10-03-93
DE-A-4041464	25-06-92	WO-A- 9211362	09-07-92

EP 211 10079

EP For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/12; C07K13/00; C07H21/00; C12Q1/68
 G01N33/50; A61K31/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTEDocumentation minimale consultée⁸

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

C12N ; C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹**III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	WO,A,9 117 174 (NEUROGENETIC CORP) 14 Novembre 1991 * Revendications, figure 3 * ---	1-3,6-8, 10-15, 19-27
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 89, no. 12, 15 Juin 1992, WASHINGTON US pages 5517 - 5521 McAllister G; Charlesworth A; Snodin C; Beer MS; Noble AJ; Middlemiss DN; Iversen LL; Whiting P; 'Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): a fifth 5HT1-like subtype.' voir le document en entier --- -/-	1-3,6-8, 10-15, 19-27

¹¹ Catégories spéciales de documents cités:^{"A"} document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent^{"E"} document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date^{"L"} document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)^{"O"} document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens^{"P"} document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée^{"T"} document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention^{"X"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive^{"Y"} document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.^{"A"} document qui fait partie de la même famille de brevets**IV. CERTIFICATION**

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 SEPTEMBRE 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29-09-1993

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

S.A. NAUCHE

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
X	DE,A,4 041 464 (BASF AG) 25 Juin 1992	1-3,6-8, 10-15, 19-27
P,X	voir le document en entier ----- EMBO JOURNAL. vol. 11, no. 13, Décembre 1992, EYNHAM, OXFORD GB pages 4779 - 4786 PLASSAT, J.L. ET AL.; 'The mouse 5HT5 receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT1D receptor family' voir le document en entier -----	1-27
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 90, Avril 1993, WASHINGTON US pages 3452 - 3456 ERLANDER M.G. ET AL.; 'Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain' voir le document en entier -----	1-27

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300650
SA 75633

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

20/09/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9117174	14-11-91	US-A- 5155218	13-10-92
		AU-A- 7879891	27-11-91
		EP-A- 0530265	10-03-93
DE-A-4041464	25-06-92	WO-A- 9211362	09-07-92

EPO F BM P0672

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82